

学校编码: 10384

密级

学号: 22420110153623

廈門大學

博 士 学 位 论 文

我国主要石首鱼科鱼类分子系统发育及大 黄鱼群体遗传结构的 DNA 标记研究

**Molecular Phylogeny of 9 Sciaenid Fishes in East China Sea
and Genetic Structure of Large yellow croaker Stocks**

江 丽 华

指导教师姓名: 苏永全 教授

专 业 名 称: 海洋生物学

论文提交日期: 2014 年 4 月

论文答辩时间: 2014 年 5 月

2014 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外，该学位论文（为吴常文教授团队、苏永全教授团队课题组的研究成果，获得国家 863 计划“基于全基因组信息的鱼类遗传选育”（2012AA10A403-3）、“新养殖海水种类苗种繁育技术”（2012AA10A413-5）等课题经费的资助，在国家海洋设施养殖工程技术研究中心、海洋生物种质资源发掘利用国家地方联合工程实验室完成。）(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文(包括纸质版和电子版)，允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

()1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于
年 月 日解密，解密后适用上述授权。

()2.不保密，适用上述授权。

(请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权)

声明人(签名)：

年 月 日

目 录

摘 要.....	I
ABSTRACT	IV
第 1 章 绪 论	1
1.1 海洋鱼类的种质资源、遗传育种及种群遗传学的 DNA 标记分析	1
1.1.1 海洋鱼类的种质资源	1
1.1.2 鱼类育种进展	2
1.1.3 线粒体基因标记 (mtDNA)	12
1.1.4 内含子多态性 (EPIC)	12
1.1.5 微卫星 (SSR) 标记	12
1.1.6 单核苷酸多态性 (SNP)	13
1.2 石首鱼的种质资源及系统学研究进展	14
1.2.1 石首鱼科一般形态特征	14
1.2.2 石首鱼科物种分布情况与生活习性	15
1.2.3 石首鱼分子系统学研究概况	16
1.3 大黄鱼种群划分及群体遗传学研究进展	18
1.3.1 大黄鱼的形态特征	18
1.3.2 大黄鱼的地理种群划分	20
1.3.3 大黄鱼的群体遗传多样性分析	24
1.4 本研究的目的和意义	25
第 2 章 基于 EPIC 核基因 DNA 序列变异分析石首鱼的系统发育关系	
2.1 材料	27
2.1.1 实验材料	27
2.1.2 主要仪器	28
2.1.3 主要试剂	28
2.2 方法	29
2.2.1 形态鉴定	29
2.2.2 利用 COI 鉴定及检测	30

2.2.3 利用核基因 DNA 序列检测	31
2.3 结果	33
2.3.1 DNA 提取	33
2.3.2 序列变异特点	34
2.3.3 碱基组成及遗传距离	35
2.3.4 系统发育树	36
2.4 讨论	38
第 3 章 大黄鱼微卫星标记在亲缘物种中的通用性研究	42
3.1 材料	42
3.1.1 实验材料	42
3.1.2 主要仪器	43
3.1.3 主要试剂	44
3.1.4 溶液配制	45
3.2 方法	45
3.2.1 DNA 模板的制备	45
3.2.2 SSR 扩增	46
3.2.3 引物筛选	47
3.2.4 SSR 扩增产物检测	48
3.2.5 数据分析	49
3.3 结果	50
3.3.1 DNA 提取	51
3.3.2 黄姑鱼多态微卫星标记的筛选	52
3.3.3 日本银姑鱼多态微卫星标记的筛选	52
3.3.4 皮氏叫姑鱼多态微卫星标记的筛选	53
3.4 讨论	54
第 4 章 应用核基因 DNA 序列和线粒体基因标记对大黄地理种群进 行划分	55
4.1 材料	56

4.1.1 实验材料	56
4.1.2 主要仪器	56
4.1.3 主要试剂	56
4.2 方法	57
4.2.1 DNA 模板的制备	58
4.2.2 PCR 扩增和测序	59
4.2.3 数据分析	59
4.3 结果	60
4.3.1 序列遗传变异	61
4.3.2 群体遗传结构	62
4.3.3 遗传距离	63
4.4 讨论	64
第 5 章 大黄鱼基因组 SNP 标记的开发与检测	68
5.1 材料	68
5.1.1 实验材料	68
5.1.2 主要仪器	69
5.1.3 主要试剂	70
5.2 方法	70
5.2.1 DNA 模板的制备	70
5.2.2 Sequenom 实验操作步骤	71
5.2.3 数据分析	76
5.3 结果	76
5.3.1 SNP 候选位点的获得	76
5.3.2 SNP 位点的群体基因型分析	79
5.3.3 SNP 位点的群体多态性分析	85
5.3.4 系统发育树	87
5.4 讨论	89
5.4.1 SNP 分型的研究	89
5.4.2 SNP 位点主要遗传学参数估计	90

5.4.3 大黄鱼 SNP 基因分型的群体遗传学分析	92
总结与展望	94
参考文献	96
在学期间主持、参与的科研项目及研究论文	106
致谢	107

Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	IV
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Genetic resources, breeding and population genetics analysis using DNA sequence in marine fishes	1
1.1.1 Genetic resources	1
1.1.2 The study of fish genetics breeding	2
1.1.3 Mitochondrial gene (mtDNA)	12
1.1.4 Exon-primed intron-crossing (EPIC)	12
1.1.5 Simple sequence repeats (SSR)	12
1.1.6 Single nucleotide polymorphism (SNP)	12
1.2 The study of genetic resources and systematic research in Sciaenidae ..	14
1.2.1 Morphological characteristics of Sciaenidae	14
1.2.2 Distribution and living habit	15
1.3 Study of identification and population genetics in <i>Larimichthys crocea</i> ·	18
1.3.1 Morphological characteristics of <i>Larimichthys crocea</i>	18
1.3.2 Geographical population identification	20
1.3.3 Study of genetic population genetics	24
1.4 Research objectives	25
Chapter 2 Phylogenetic estimation of Sciaenidae in the East China Sea inferred from nuclear DNA sequence	27
2.1 Materials	28
2.1.1 Samples	28
2.1.2 Main instruments	29
2.1.3 Primary reagent	29
2.2 Methods	29
2.2.1 Morphological identification	29

2.2.2 Identification with COI sequences	30
2.2.3 Detection with EPIC DNA sequences	31
2.3 Results	33
2.3.1 DNA extraction	33
2.3.2 Sequence variation	34
2.3.3 C,G contents and genetic distance	35
2.3.4 Phylogenetic trees	36
2.4 Discussion	38
Chapter 3 New microsatellite markers for <i>Larimichthys crocea</i> and cross-amplification in closely related species	42
3.1 Materials	42
3.1.1 Samples	43
3.1.2 Main instrument	44
3.1.3 Primary reagent	44
3.2 Methods	45
3.2.1 DNA extraction	46
3.2.2 PCR amplification	46
3.2.3 Primer selection	48
3.2.4 Data analysis	49
3.3 Results	50
3.3.1 DNA extraction	51
3.3.2 SSR polymorphism test in <i>Nibea albiflora</i>	51
3.3.3 SSR polymorphism test in <i>Pennahia argentata</i>	52
3.3.4 SSR polymorphism test in <i>Johnius belangerii</i>	52
3.4 Discussion	54
Chapter 4 Genetic diversity and population identification of <i>Larimichthys crocea</i> revealed by the mitochondrial and nuclear DNA sequence	55

4.1 Materials	56
4.1.1 Samples	56
4.1.2 Main instrument	56
4.1.3 Primary reagent	56
4.2 Methods	57
4.2.1 DNA extraction	58
4.2.2 PCR amplification	59
4.2.3 Primer selection	59
4.3 Results	60
4.3.1 Sequence variation	61
4.3.2 Population genetic structure	62
4.3.3 Genetic distance	63
4.4 Discussion	64
Chapter 5 Development and application of SNP markers in genome of <i>Larimichthys crocea</i>	68
5.1 Materials	68
5.1.1 Samples	68
5.1.2 Main instrument	69
5.1.3 Primary reagent	70
5.2 Methods	70
5.2.1 DNA extraction	70
5.2.2 Sequenom MassARRAY genotyping	71
5.2.3 Data analysis	76
5.3 Results	76
5.3.1 Candidate loci	76
5.3.2 SNP genotyping of <i>Larimichthys crocea</i> populations	79
5.3.3 Polymorphic analysis	85
5.3.4 Phylogenetic tree	88
5.4 Discussion	89

5.4.1 Method of SNP genotyping	89
5.4.2 Genetic parameters	90
5.4.3 Population genetics analysis	92
Conclusion and prospect.....	94
References	96
Research projects attended and publications.....	106
Acknowledgments.....	107

摘要

石首鱼科 (Sciaenidae) 隶属鲈形目, 在全世界范围内共有70个属300余种, 是鲈形目中属种最多的科之一。我国沿海石首鱼类种属众多, 共有17个属30多种。石首鱼科的绝大多数种类肉味鲜美、经济价值高, 是海洋渔业和海水养殖的重要对象。石首科鱼类是我国海洋经济鱼类中产量最大的类群之一, 其中大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 曾占据着中国“四大海产”的“半壁江山”, 是中国重要的海洋经济鱼类。

本研究以我国常见石首鱼的系统发育关系为切入点, 分析大黄鱼SSR在亲缘物种中的通用性, 进而利用EPIC标记、线粒体COI基因中的DNA序列多态性和SNP深入分析大黄鱼种群遗传多样性, 主要结果如下:

(1) 基于EPIC核基因DNA序列和线粒体COI基因序列多态性变异分析石首鱼的系统发育关系

利用核基因序列内含子多态性 (EPIC) 及线粒体COI基因对常见9种石首鱼的系统发育关系进行了分析, 两种不同的分析途径产生的结果略有不同, 从所构建的两种进化树来看, 最大的区别是皮氏叫姑鱼 (*Johnius belangerii*) 黄姑鱼 (*Nibea albiflora*) 及鳊鱼 (*Miichthys miiuy*) 的进化差异。基于线粒体COI基因分析得出的结果表明, 皮氏叫姑鱼处于最底端, 单独成一支, 而其它种聚类成一大支; 鳊鱼位于黄鱼亚科的底端, 棘头梅童鱼 (*Collichthys lucidus*) 与大黄鱼及小黄鱼 (*Larimichthys polyactis*) 聚类成一支。

核基因DNA序列所构建的系统发育树表明, 9种石首鱼共分为两组, 一组由黄鱼属及梅童鱼属组成; 另一组则由皮氏叫姑鱼、黄姑鱼 (*Nibea albiflora*)、白姑鱼 (*Pennahia argentata*)、眼斑拟石首鱼 (*Sciaenops ocellatus*) 及日本银姑鱼 (*Argyrosomus japonicus*) 组成。皮氏叫姑鱼与黄姑鱼组成一支; 鳊鱼则单独一支, 处于皮氏叫姑鱼、黄姑鱼、白姑鱼、眼斑拟石首鱼及日本银姑鱼这一大支的底部。

石首鱼的系统发育关系仍纷繁复杂, 有待于用更多的分子手段、方法及更广泛的物种来进一步理顺及验证。

(2) 大黄鱼微卫星标记在其亲缘物种中的通用性研究

在大黄鱼全基因组DNA序列的基础上, 本实验室新开发了73对大黄鱼微卫

星, 本文利用其中27对微卫星对大黄鱼亲缘关系较近的皮氏叫姑鱼、黄姑鱼及日本银姑鱼进行扩增分析。结果表明: 27对微卫星序列中, 在皮氏叫姑鱼这一物种中成功扩增出24对, 在黄姑鱼这一物种中成功扩增出26对, 在日本银姑鱼这一物种中成功扩增出25对。等位基因数目为6-14, 观测杂合度最高为0.372, 最低为0.078; 期望杂合度分别最高为0.905, 最低为0.515; 大部分大黄鱼微卫星引物都能在这三种石首鱼中成功扩增并表现为等位基因多态性; 可见, 利用相近物种微卫星标记不但降低了微卫星开发的费用, 而且提高了微卫星的利用效率, 为微卫星的推广及应用提供了条件, 对于濒危物种如日本银姑鱼研究意义更大, 为进一步探讨大黄鱼及其相近物种的亲缘关系、石首鱼类的通用性引物、石首鱼类的杂交育种等提供了参考资料。

(3) 应用核基因DNA序列和线粒体基因标记对大黄地理种群进行划分

大黄鱼种群划分较为复杂, 数十年来, 对大黄鱼种群的划分一直争议不断。另外, 由于过度捕捞及生境破坏, 大黄鱼野生资源逐渐枯竭, 然而, 在大黄鱼成功繁育的同时, 人工增殖放流、南北接力养殖及网箱逃逸等现象, 加之或研究方法或取样差异, 导致如今大黄鱼地理种群及种质资源的归属更加复杂, 争议很大。鱼类的种群分化对于鱼类种质资源保护及管理意义重大, 只有深入了解大黄鱼种群的遗传背景及资源状况, 才能更好地保护大黄鱼及做好大黄鱼育种。本研究从全新的角度, 利用核基因标记, 并从9个标记中筛选出最佳两个, 结合线粒体COI基因DNA序列来分析大黄鱼地理种群多样性。根据核基因DNA序列的分析结果, 舟山野生群、漳浦野生群以及海南野生群这三个野生群几乎可以分为三支, 舟山野生群与漳浦野生群相对较近, 海南野生群单独一支, 处于聚类的最末端; 从遗传距离来看, 海南野生群与其它两个野生群距离最远。划分结果与上世纪60年代的传统形态学划分并不十分一致, 而与张其永等对大黄鱼的地理种群划分比较相近; 由此可以从分子标记的基础上推测, 不同地理种群的大黄鱼差异的确存在, 这为现阶段大黄鱼地理种群的划分提供了新的参考。

(4) 大黄鱼基因组SNP标记的开发与检测

本实验室利用二代测序技术获得了619Mb大小、平均测序深度82x、覆盖范围为88%的大黄鱼基因组草图, 本文利用Sequenom MassARRAY分型技术, 在大黄鱼基因组草图的基础上, 运用筛选的60个SNP候选位点, 针对舟山野生群、漳

浦野生群、海南澄迈野生群及宁德养殖群的大黄鱼进行遗传背景分析。结果表明：有效等位基因数分布范围1.328-1.341，平均1.335。期望杂合度和观测杂合度分布范围分别为0.273-0.320和0.190-0.235，多态信息含量分析显示147个SNP位点的PIC值范围为0.215-0.0.247，低于0.25。从遗传分化系数 F_{st} 来看，所有群体间的 F_{st} 值都在0-0.05之间。60个SNP候选位点中，57组得到良好的分型效果。一共有AA，CA，CC，CT，TT，GG，GA，GT，AT，GC 10个基因型。57个SNP位点中，有29个是转换，占48%，31个是颠换，占52%。SNP标记为2等位基因标记，分型结果表明2个等位基因在分型中都能检测到。共检测到147个等位基因位点，最小基因频率范围从 0.378 到 0.497。对于全部 SNP 位点，AA，CC，TT，GG型比例明显高于CA，CT，GA，GT，AT，GC型。AT，GC基因型为稀有突变型，说明这些位点可以在遗传多样性分析和种群结构分析中加以使用。得出57个基因分型散点图。结果表明，scf117，scf708，scf247为舟山野生大黄鱼特有的标记，scf559 漳浦野生大黄鱼特有标记，scf100，scf166为海南野生大黄鱼特有标记，scf305、scf664为宁德养殖大黄鱼特有标记。从大黄鱼基因组在线数据库可以看出，其中，scf117，scf187以及scf511为编码区SNP标记，分别参与编码 Acid-Induced Differentiation Factor (ATRAID)，Protein FAM210B 及NCKAP5: Nck-associated protein 5蛋白。总之，本文所开发的57个SNP标记，为进一步的大黄鱼种群鉴定、遗传多样性分析和分子标记辅助育等方面提供了基础资料。

关键字：石首鱼；系统发育；大黄鱼；群体遗传；DNA分子标记

Abstract

Sciaenid fishes (family Sciaenidae) are very important marine fish resource and attractive species for aquaculture. There are a number of species in this family in China Sea, with about 30 species in 17 genera. Due to a prolonged period of overfishing, the resources of sciaenid fishes have been remarkably declined, some species even was listed as endangered, such as *Larimichthys crocea*, it used to be one of the most important commercial fishes in China, but the wild populations have been collapsed since 1970s.

The contents of this study includes the following four parts: phylogenetic estimation of Sciaenidae in the East China Sea inferred from nuclear DNA sequence; New microsatellite markers for *L. crocea* and cross-amplification in closely related species; Genetic diversity and population identification of *L. crocea* revealed by the mitochondrial and nuclear DNA sequence and development and application of SNP markers in genome of *L. crocea*, the main results are as follows:

(1) Phylogenetic estimation of Sciaenidae in the East China Sea inferred from nuclear DNA sequence

Fish of the family Sciaenidae (croaker or drum fish, family Sciaenidae) are highly important commercial fishery resources. They are mainly distributed along the Pacific Ocean, Atlantic Ocean, Indian Ocean and south of East Africa. The systematic and phylogenetic relationships of the Sciaenidae have been widely debated. Morphologic disparity among the *sciaenids* has prompted numerous conflicting phylogenetic hypotheses because of a lack of clear synapomorphies, the ability of morphology to resolve such phylogenetic conflict is limited. Here we describe a phylogenetic analysis of sciaenids of the East China Sea based on nuclear exon-primed intron-crossing genes (EPIC) and a mitochondrial gene (COI). Separate analyses of the two data partitions resulted in mostly congruent trees. Although there were some differences in the classification of these species, the main difference between trees obtained by the mitochondrial gene (COI) and nuclear DNA sequences

was the position of *Miichthys miiuy* and *Johnius belangerii*. In the mitochondrial phylogeny, *J. belangerii* was placed at the most basal position forming an individual clade, while other species formed another large cluster. *M. miiuy* formed an independent basal sub-clade grouped with *Larimichthys* and *Collichthys*. *Collichthys lucidus* was grouped with *Pseudosciaenacrocea* and *Larimichthys polyactis*. Trees based on the nuclear genes differed somewhat from those based on the mitochondrial gene COI. In this analysis, two groups resulted, the *Larimichthys* and *Collichthys* clade, and another clade including a total of five species: *J. belangerii*, *Nibea albiflora*, *Pennahia argentata*, *Sciaenops ocellatus*, and *Argyrosomus japonicus*; *J. belangerii* clustered with *N. albiflora*. *M. miiuy* was placed at the basal position of the other cluster because it was an independent basal sub-clade grouped with *J. belangerii*, *N. albiflora*, *P. argentata*, *S. ocellatus*, and *A. japonicus*. Many aspects of the phylogeny of the Sciaenidae remain unresolved, and further analysis based on more molecular information and extensive taxon sampling is necessary to elucidate the phylogenetic relationships among the major lineages within Sciaenidae.

(2) New microsatellite markers for *L. Crocea* and cross-amplification in closely related species

The large yellow croaker (*L. crocea*), included in the suborder Percoidei, family Sciaenidae, and genus *Pseudosciaena*, is one of the most economically marine fish in China, which is mainly limited to coastal waters of continental East Asia. Due to various of factors including over wintering aggregations, poor stock management, heavy exploitation habitat pollution and marine ecosystem shift, the wild resources of the large yellow croaker has almost collapsed. Management and artificial cage culture were introduced by the Chinese governmental organizations since 1980s in order to restore the wild stocks and the artificial culture of this species got successful. However, there is still a long way to go to restore the wild stocks. At the same time, an understanding of the genetic background of the large yellow croaker populations is significantly and urgent for resource conservation and breeding. We identified and characterized 27 microsatellites from *L. crocea*. We cross-amplified the 27

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”. Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库